

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520121153155

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

仔猪脑发育及唾液酸饮食干预对多聚/三聚
唾液酸相关蛋白和基因表达的影响

The Expression of PolySia/TriSia Associated
Proteins and Genes on Developing Brain and the
Effect of Dietary Sialic Acid Intervention in Piglets

任 贺

指导教师姓名: 王 冰 教授

专 业 名 称: 微 生 物

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(神经营养)
课题(组)的研究成果,获得(神经营养)课题(组)
经费或实验室的资助,在(神经营养)实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 任贺

2015 年 5 月 19 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ √ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：任贺

2015 年 5 月 19 日

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
缩写词表	V
1. 前言	1
1.1 唾液酸.....	1
1.1.1 唾液酸的结构.....	1
1.1.2 唾液酸的多样性	1
1.1.3 唾液酸的分布.....	2
1.1.4 唾液酸的功能	3
1.1.5 唾液酸的生物合成.....	3
1.1.6 唾液酸转移酶.....	3
1.2 多聚唾液酸和三聚唾液酸.....	4
1.2.1 多聚/三聚唾液酸的生物合成.....	4
1.2.2 三聚唾液酸的表达及功能推断	5
1.2.3 细胞因子的多聚唾液酸化	6
1.2.4 脑发育期间的多聚唾液酸化	9
1.2.5 不同脑区的多聚唾液酸化	10
1.2.6 多聚唾液酸和学习记忆.....	11
1.3 唾液酸饮食干预对早期学习记忆的影响.....	12
1.3.1 以啮齿类动物为模型进行唾液酸饮食干预的研究	12
1.3.2 唾液酸饮食干预对仔猪认知能力的影响	13
1.4 良好的动物模型-猪	13
1.5 本课题的研究目的及意义.....	13
2. 材料与方法.....	15
2.1 材料.....	15

2.1.1 实验仪器	15
2.1.2 实验试剂及耗材	16
2.1.3 自配试剂	18
2.2 方法.....	19
2.2.1 配方奶粉的制备	19
2.2.2 仔猪的饲养	19
2.2.3 样本取材	20
2.2.4 总 RNA 的提取和反转录	21
2.2.5 内参基因的选择	21
2.2.6 荧光定量 PCR.....	22
2.2.7 总蛋白的提取及浓度测定	23
2.2.8 多聚唾液酸酶切反应和蛋白变性	24
2.2.9 Western Blot.....	24
2.2.10 八臂迷宫实验简介	26
3.结果与分析.....	27
3.1 定量 PCR 引物设计及条件优化.....	27
3.2 仔猪脑发育中多聚/三聚唾液酸相关基因和蛋白的表达.....	35
3.2.1 仔猪脑发育中 ST8SiaII, ST8SiaIII, ST8SiaIV, NCAM, SynCAM1, NRP-2 mRNA 的表达量.....	35
3.2.2 仔猪脑发育中 PolySia、NCAM、未唾液酸化 NCAM 和 triSia 的蛋白表 达.....	42
3.3 唾液酸饮食干预对仔猪海马组织中多聚唾液酸相关的基因及蛋白表达的 影响.....	48
3.3.1 仔猪海马组织中 NCAM, SynCAM1, NRP-2 的基因表达	48
3.3.2 仔猪海马组织中 PolySia 的表达	53
4. 结论与讨论.....	56
4.1 仔猪脑发育中多聚/三聚唾液酸相关的基因和蛋白的表达.....	56
4.2 唾液酸饮食干预对多聚唾液酸相关蛋白和基因表达的影响.....	57

参考文献	59
------------	----

致 谢	65
-----------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract(Chinese)	I
Abstract(English)	III
Abbreviations	V
1.Introduction	1
1.1 Sialic acid	1
1.1.1The structure of sialic acid.....	1
1.1.2 The diversity of sialic acid.....	1
1.1.3 The distribution of sialic acid	2
1.1.4 The function of sialic acid.....	3
1.1.5 Sialic acid biosynthesis	3
1.1.6 Sialytransferases	3
1.2 Poly/tri sialic acid	4
1.2.1 The biosynthesis of poly/tri sialic acid	4
1.2.2 Trisialic acid expression and function.....	5
1.2.3 Polysialylated cytokines.....	6
1.2.4 Polysialylate during brain development of piglets.....	9
1.2.5 Polysialylate in different brain regions	10
1.2.6 The relationship between polysia and study or memory	11
1.3 Sia dietary intervention have impact on study and memory	12
1.3.1 To explore sia dietary intervention for model as rodent animal	12
1.3.2 Sia dietary have impact on cognition of piglets.....	13
1.4 Favourable animal model-piglets	13
1.5 Purposes and significances of the topic	13
2. Materials and Methods	15
2.1 Materials	15

2.1.1 Instruments.....	15
2.1.2 Reagents and Consumables.....	16
2.1.3 Self-made reagents.....	18
2.2 Methods	19
2.2.1 Preparation of formula milk.....	19
2.2.2 Rearing piglets	19
2.2.3 Samples drawn	20
2.2.4 Total RNA extraction and reverse transcription.....	21
2.2.5 Select the internal reference genes.....	21
2.2.6 Real-time quantitative PCR	22
2.2.7 Extraction and determination of total protein concentration	23
2.2.8 Polysialic acid digestion reaction and protein denaturation	24
2.2.9 Western Blot.....	24
2.2.10 The description of 8-arm radial maze	26
3. Results	27
3.1 Real time Quantitative PCR PRIMER DESIGN AND Optimization	27
3.2 Poly / tri sialic acid-related genes and proteins Expression of brain development in piglets.....	35
3.2.1 ST8SiaII, ST8SiaIII, ST8SiaIV, NCAM, SynCAM1, NRP-2 mRNA expression in brain development of piglets	35
3.2.2 PolySia, NCAM, non- polysialylated NCAM,triSia expression in brain development of piglets	42
3.3 Sialic diet intervention have impact on gene and protein expression in the hippocampus associated piglets polySialic acid	48
3.3.1 NCAM, SynCAM, NRP-2 mRNA expression in hippocampus	48
3.3.2 PolySialic acid expression in hippocampus	53
4.Discussion.....	56
4.1 Poly / tri sialic acid-related genes and proteins Expression of brain	

development in piglets.....	56
4.2 Sialic diet intervention have impact on gene and protein expression in the hippocampus associated piglets polySialic acid	57
Referances.....	59
Acknowledgement	65

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

研究背景：唾液酸（Sialic acid, Sia）是一类九碳单糖神经氨酸的总称，在细胞表面发挥其多种生物学功能。在体内，Sia 通常以游离唾液酸、聚唾液酸（多聚/寡聚）、唾液酸衍生物（糖蛋白，糖脂）这三种形式存在。多聚唾液酸（polySialic acid, ploySia），一种唾液酸残基通过 $\alpha 2-8$ 键连接而成的线性聚合物，广泛分布于在哺乳动物神经系统中，它的主要蛋白载体是神经细胞粘附因子（Neural cell adhesion molecule, NCAM）。PolySia-NCAM 在细胞迁移、神经突生长、轴突延伸、突触发生及其可塑性等方面发挥作用，且它的合成主要由多聚唾液酸转移酶 ST8SiaII 和 ST8SiaIV 负责。此外，NG2 细胞和人类 DC 细胞表面也分别检测到了突触细胞粘附因子 1（Synaptic cell adhesion molecule1, SynCAM1）和神经纤毛蛋白-2（Neuropilin-2, NRP-2）的多聚唾液酸化。与多聚唾液酸相比，三聚唾液酸（triSialic acid, triSia）通常是连接在神经节苷脂上，但是最近的研究表明 triSia 也可以连接在糖蛋白上，可能由 ST8SiaIII 负责合成，其功能可能与少突胶质细胞的分化有关。

研究目的：1、通过对多聚/三聚唾液酸在 3 日龄和 38 日龄仔猪不同脑区中相关的蛋白和基因进行检测，分析其在仔猪不同脑区及发育中的表达变化。2、对仔猪进行唾液酸饮食干预，通过检测多聚唾液酸相关蛋白和基因的表达变化，探究饮食摄入唾液酸对学习能力的影

研究方法：1. 选用 3 日龄（ $n=3$ ）和 38 日龄（ $n=3$ ）雄性仔猪为动物模型，通过 Western Blot 和 Q-PCR 实验方法对其不同脑区（海马、前额叶、顶叶、枕叶、丘脑、小脑、脑干、杏仁复合体、嗅球）中 polySia、NCAM 和 triSia 的蛋白表达以及 ST8SiaII、ST8SiaIII、ST8SiaIV、NCAM、SynCAM1、Neuropilin-2 的 mRNA 表达进行检测。2. 设立对照组（ $n=12$ ）和唾液酸处理组（ $n=12$ ），从 3 日龄仔猪开始进行唾液酸饮食干预，并在仔猪发育期间使用八臂迷宫实验对其进行学习能力的训练及测试，对 38 日龄仔猪海马区 polySia 表达量及 NCAM、SynCAM1、NRP-2 的 mRNA 表达量进行检测，将其和行为学实验指标进行相关性分析。

研究结果：在仔猪脑发育过程中，（1）ST8SiaII、ST8SiaIV mRNA 的表达及 polySia 的表达均下降；（2）总 NCAM 蛋白表达水平下降，在顶叶、枕叶和小

脑组织中, NCAM-140 蛋白上连接大量 polySia; (3) 所有脑组织中 NCAM、SynCAM1、NRP-2 mRNA 的表达水平都下降, 且丘脑中 SynCAM1、NRP-2 mRNA 表达下降的比例远大于 NCAM, 小脑中 NCAM、SynCAM1 mRNA 表达下降的比例远大于 NRP-2; (4) 仔猪脑中 triSia 连接的四条蛋白质分子量分别为 130KD、100KD、80KD、70KD, 总 triSia 的表达水平和 ST8SiaIII mRNA 的表达水平均降低; (5) 对仔猪进行唾液酸饮食干预, NCAM、SynCAM1、NRP-2 mRNA 的表达水平及 polySia 的表达水平增加, 它们的表达结果和仔猪在八臂迷宫实验中的总犯错次数呈负相关性, 其中 polySia、NRP-2 与总犯错次数的负相关性具有统计学意义。

结论: 首先, PolySia、NCAM 的蛋白水平以及 ST8SiaII、ST8SiaIV、NCAM、SynCAM1、NRP-2 的 mRNA 水平在仔猪不同脑组织间表达不同, 且随着仔猪脑发育的进行, 表达水平都有下降的趋势。所以 polySia、NCAM、ST8SiaII、ST8SiaIV、SynCAM1、NRP-2 是仔猪脑发育的重要标记物。其次, 仔猪脑中 triSia 连接的四条蛋白质分子量分别为 130KD、100KD、80KD、70KD, 且随着仔猪脑发育的进行, 总 triSia 及 ST8SiaIII 也都有下降的趋势。最后, 唾液酸饮食干预显著提高仔猪 NCAM、SynCAM1 的 mRNA 表达水平, 同时也增加了 NRP-2 的 mRNA 表达及 polySia 蛋白表达水平, 且 polySia 的蛋白表达量以及 NRP-2 mRNA 表达与仔猪犯错次数呈负相关, 唾液酸饮食干预可以提高仔猪的学习能力。

关键词: 多聚唾液酸; 三聚唾液酸; 饮食干预

Abstract

Background: Sialic acid (Sia) is a family of nine-carbon monosaccharide, playing its biological functional roles on the cell surface. In vivo, Sia generally has four forms: free sialic acid, poly/oligo sialic acid, sialic acid derivatives (glycoproteins, glycolipids). Polysialic acid (polySia), a kind of linear polymer of α 2,8-glycosidically linked sialic acid residues, widely distributed in the mammalian nervous system. The most prominent protein carrier is neural cell adhesion molecule (NCAM), two polysialyltransferase named ST8SiaII and ST8SiaIV were shown to be capable of producing polySia-NCAM. Moreover, polySia-NCAM plays an important role in cell migration, neurite outgrowth, axon extension, synaptogenesis and plasticity. The synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM1) and neuropilin -2 (NRP-2) which detected on NG2 cells and human DC cell surface were polysialylated also. In contrast to polySia, shorter oligomers chains with three Sia residues, which named trisialic acid (triSia) which is the common structural unit of gangliosides. Recent studies show that triSia is also connected to the glycoprotein and perhaps play a similar role in differentiation of oligodendrocyte, ST8SiaIII maybe responsible for the its synthesis.

Objectives: (1) Analysis poly/triSia change in development piglets by detecting the expression of relevant protein and mRNA in different brain regions. (2) To explore the effect of Sia dietary Sia intervention on study and memory of piglets by detecting the expression of relevant protein and mRNA.

Methods: We chose 3-day(n=3) and 38-day(n=3) old male piglets as the animal models to analyze the expression of polySia, NCAM and triSia protein levels and ST8SiaII, ST8SiaIII, ST8SiaIV, NCAM, SynCAM1, Neuropilin-2 mRNA expression in different brain regions (hippocampus prefrontal, parietal, occipital lobe, thalamus, cerebellum, brainstem, almonds complex, olfactory bulb) by using Western Blot and Q-PCR methods. We also using piglets model and treat them with dietary sialic acid

intervention(control group, n=12, Sia-treatment group, n=12) from 3-day to 38-day old. The 8-arm radial maze was used to assess the learning and memory capacity of piglets. The expression of polySia protein levels and NCAM、SynCAM1、NRP-2 mRNA levels in 38-day old piglet's hippocampus were analyzed.

Results: During brain development of piglets, (1) ST8SiaII and ST8SiaIV mRNA expression and polySia expression show a decreasing tendency in all brain regions. (2) The expression levels total NCAM protein were decreased, but more polySia binding NCAM-140 in parietal lobe, occipital lobe and cerebellum than other tissue (3) NCAM、SynCAM1 and NRP-2 mRNA expression were decreased in all brain regions. SynCAM1 and NRP-2 mRNA drop rate more than NCAM in thalamus. NCAM、SynCAM1 mRNA drop rate more than NRP-2 in cerebellum. (4) In piglets brain, protein-conjugated triSia binding to four proteins with the molecular weight of 130KD, 100KD, 80KD, 70KD. Protein-conjugated triSia and ST8SiaIII mRNA expression levels were decreased in all brain regions with piglet's development.(5) PolySia expression and NCAM, SynCAM, NRP-2 mRNA expression in Sia-treatment group were higher than that in control group. PolySia、NRP-2 mRNA expression levels in hippocampus are negatively correlated with total number of mistakes(found accessible milk) in 38 days old piglets.

Conclusions: First, PolySia、NCAM protein level, and ST8SiaII、ST8SiaIV、NCAM、SynCAM1、NRP-2 mRNA expression levels in different piglet brain is different, and with the brain development, the expression levels have decreased. So polySia, NCAM, ST8SiaII, ST8SiaIV, SynCAM1, NRP-2 are important markers in brain development of piglets. Secondly, four protein molecular weight binding triSia in brain are 130KD、100KD、80KD、70KD, and with the brain development, total triSia and ST8SiaIII also have a downward trend. Finally, sialic acid dietary intervention significantly improved piglet NCAM、SynCAM1 mRNA expression, but also increased the NRP-2 mRNA and polySia expression levels, which are negatively related with total mistakes. Sialic acid dietary intervention can improve learning ability in piglets.

Keywords: polySialic acid, triSialic acid, dietary intervention

缩写词表

Sia	Sialic acid 唾液酸
PolySia	Polysialic acid 多聚唾液酸
TriSia	Trisialic acid 三聚唾液酸
NCAM	Neural cell adhesion molecule 神经细胞粘附分子
SynCAM1	Synaptic cell adhesion molecule1 突触细胞粘附因子 1
NRP-2	Neuropilin-2 神经纤毛蛋白-2
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid 互补脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic Acid 核糖核酸
mRNA	Message Ribonucleic Acid 信使核糖核酸
qPCR	Real-time Quantitative PCR 实时荧光定量聚合酶链式反应
ST8SiaII	ST8 α -N-acetylneuraminide α -2,8-sialyltransferase II 多聚唾液酸转移酶 II
ST8SiaIII	ST8 α -N-acetylneuraminide α -2,8-sialyltransferase III 多聚唾液酸转移酶 III
ST8SiaIV	ST8 α -N-acetylneuraminide α -2,8-sialyltransferase IV 多聚唾液酸转移酶 IV
H	Hippocampus 海马区
Pf	Prefrontal lobe 前额叶
PL	Parietal lobe 顶叶
OL	Occipital lobe 枕叶
Th	Thalamus 丘脑
Ce	Cerebellum 小脑
Bs	Brainstem 脑干
An	Amygdaloid nuclear complex 杏仁复合体
Ob	olfactory bulb 嗅球

1. 前言

1.1 唾液酸

70 多年前, Blix 等人^[1, 2]在牛颌下腺粘蛋白中发现唾液酸的存在。唾液酸是一类九碳单糖神经氨酸的总称, 在细胞表面发挥其多种生物学功能^[3, 4]。

1.1.1 唾液酸的结构

唾液酸有 3 种常见亚型: a. N-乙酰神经氨酸 (N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac); b. N-羟乙酰神经氨酸 (N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc); c. 脱氨神经氨酸 (Ketodeoxynonulosonic acid, KDN) (图 1.1.1)。Neu5Ac 在人体中是最常见的, 具有较强的酸性 (pKa 值 2.6)。KDN 在人胎儿红细胞及卵巢癌中存在^[5]。而内源性 Neu5Gc 在人体组织中很难检测到, 这是由于约 280 万年前人类 CMAH 基因外显子中丢失了 92 对碱基的 DNA 片段, 而该段 DNA 编码的氨基酸序列正是 CMAH 酶活性所需要的关键序列。所以, 在正常人体组织中没有 Neu5Gc, 而这在人类进化的历史长河中起到关键的作用, 是人类与猿类的重要分化点^[6]。不过在人类癌症组织中, 可以检测到 Neu5Gc^[7]。

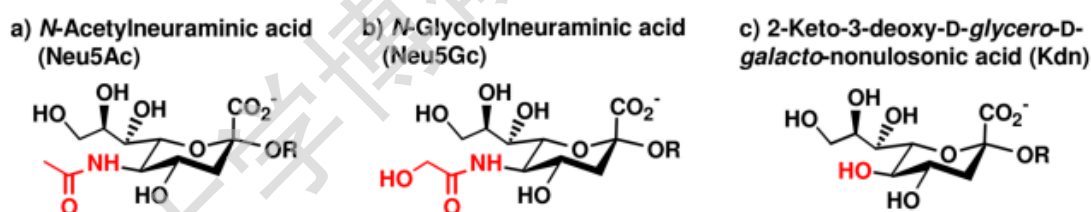


图 1.1.1 唾液酸三种亚型的结构示意图^[3]

Figure 1.1.1 Three subtypes structure of sialic acid

1.1.2 唾液酸的多样性

C-5 的变化决定着唾液酸的核心结构 (图 1.1.2), 而 C-4, C-7, C-8, 和/或 C-9 连接的 O 被取代 (包括乙酰基, 甲基, 乳酰, 硫酸盐, 和磷酸盐基团), 进一步使其结构多元化^[8, 9]。此外, C-1 羧酸酯可以形成内酯和内酰胺, 中和其电荷。目前, 已经确认超过 50 种天然存在的唾液酸结构。有时, 唾液酸的多样性与其功能相关。例如, 丙型流感病毒的血凝素仅连接 Neu5Ac 的 9-O-乙酰基^[10], 通过唾液酸特异性的 O-乙酰酯酶, 使细胞中萌芽病毒完成释放^[11]。在非人类的

灵长类动物中，Siglec-9，一种唾液酸结合免疫调节蛋白，优选或专一性结合在 Neu5Gc 上。相反，人类的 Siglec-9 有着相对广泛的特异性，可以识别 Neu5Ac 和 Neu5Gc。由此推断，这种人类谱系 Siglec-9 能力的变异与 Neu5Gc 一样提供了一种选择优势^[12]。

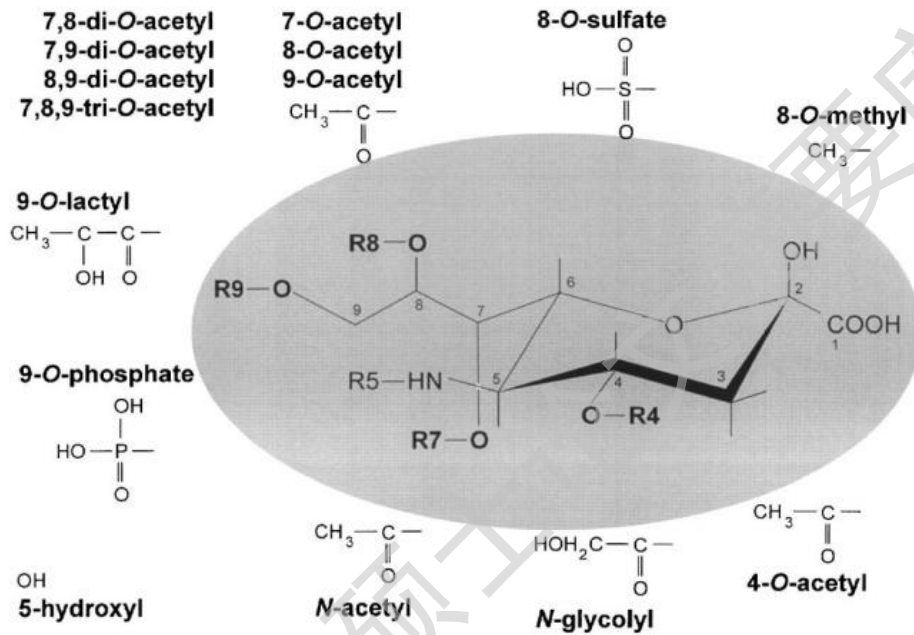


图 1.1.2 唾液酸的结构多样性^[9]

Figure 1.1.2 Structural diversity of sialic acid

1.1.3 唾液酸的分布

唾液酸在后口动物谱系（脊椎动物和少数高等无脊椎动物）中表达十分丰富^[8]。在其他谱系（细菌，古生菌，植物，真菌，原生动物，原肢类）中，只发现有少数几个物种有唾液酸的表达。例如神经侵入性细菌（大肠杆菌 K 和 B 群脑膜炎奈瑟菌）、革兰氏阴性菌等，且通常是严重疾病的病原体^[13]。

唾液酸在中枢神经系统中的含量十分丰富，其中神经细胞膜上的唾液酸含量是其他细胞膜的 20 倍^[14]。在哺乳动物脑内唾液酸的主要存在形式是 Neu5Ac，但是，在所有其他的非脑器官和体液中，Neu5Gc 也是很普遍的（除了人类）。在人类中枢神经系统中，有 65% 的唾液酸表达在神经节苷脂中，32% 的唾液酸表达在糖蛋白中，还有 3% 以游离形式存在^[15]。在哺乳动物中，脑是唯一的唾液酸在神经节苷脂中比在糖蛋白中多的器官。但是神经节苷脂在脑中的分布不均衡，

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.